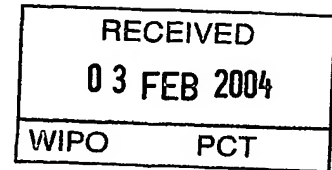
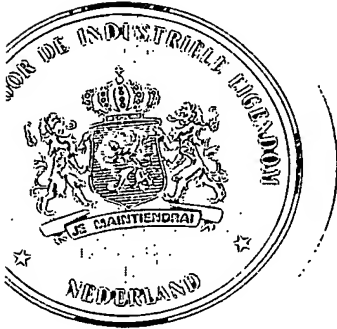


KONINKRIJK DER



NEDERLANDEN

Bureau voor de Industriële Eigendom



Hierbij wordt verklaard, dat in Nederland op 12 december 2002 onder nummer 1022152,  
ten name van:

**NEDERLANDSE ORGANISATIE VOOR TOEGEPAST-  
NATUURWETENSCHAPPELIJK ONDERZOEK TNO**  
te Delft

een aanvraag om octrooi werd ingediend voor:

"Procescontrole gebaseerd op analyse van microbiële populaties",  
en dat de hieraan gehechte stukken overeenstemmen met de oorspronkelijk ingediende stukken.

Best Available Copy

Rijswijk, 9 januari 2004

De Directeur van het Bureau voor de Industriële Eigendom,  
voor deze,

Mw. M.M. Enhus

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

1022152

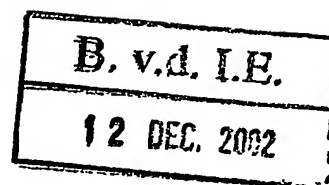
21

R. v. d. I.E.
12 DEC 1967

## UITTREKSEL

De onderhavige uitvinding heeft betrekking op het bepalen van omgevingscondities ten behoeve van procescontrole met behulp van micro-organismen. De onderhavige uitvinding maakt gebruik van het principe dat veranderingen in de samenstelling van een microbiële populatie na het toedienen van een uitwendige prikkel karakteristiek is voor de aard van de prikkel die de microbiële populatie ontvangt. Door deze veranderingen te meten kan de samenstelling van een microbiële populatie worden gebruikt als een specifieke sensor om omgevingscondities te bepalen, om de mate van verandering in deze omgevingsconditie te bepalen, om de aard en hoogte van de prikkel vast te stellen en om de effecten van uiteenlopende prikkels op diverse processen te kunnen meten en daarmee deze processen te beheersen.

10 22 152



P60862NL00

Titel: Procescontrole gebaseerd op analyse van microbiële populaties

De onderhavige uitvinding heeft betrekking op een werkwijze voor het bepalen van een omgevingsconditie. In het bijzonder heeft de uitvinding betrekking op een werkwijze voor het bepalen van een omgevingsconditie ten behoeve van procescontrole.

5 Van vele industriële en natuurlijke processen, zoals de fermentatieve bereiding van voedsel of de werking van het menselijk spijsverteringskanaal, zijn de procesparameters en de heersende procescondities niet gemakkelijk te bepalen. Als gevolg van die afwezigheid van kennis omtrent de heersende procescondities is ingrijpen in of sturing  
10 van dergelijke processen erg moeilijk en meestal inefficiënt. De toestand of conditie van een proces wordt in belangrijke mate beïnvloed door de omgeving. Echter, ook deze omgevingscondities zijn vaak moeilijk te bepalen. Een werkwijze voor het bepalen van een omgevingsconditie kan daarom waardevolle informatie verschaffen over de heersende invloeden op  
15 een bepaald proces. Evenzo zou informatie omtrent de heersende procescondities, de sturing van dat proces aanzienlijk vergemakkelijken.

Met de term omgevingsconditie wordt hierin in brede zin de fysische, biologische en/of chemische toestand van de omgeving bedoeld.

De omgevingsconditie in processen als biofilmvorming,  
20 mineralisatie in de bodem, tandbederf, waterzuivering, biodegradatie, productkwaliteit vermindering en infectie is bijvoorbeeld te herleiden uit fysische, biologische of chemische parameters die bij dat proces een rol spelen.

Tegenwoordig is een grote verscheidenheid aan omgevingscondities  
25 eenvoudig te meten met speciaal daarvoor ontwikkelde instrumenten. Ook specifieke biosensoren zijn voor het meten van een aantal chemische

171

verbindingen beschikbaar. De meeste chemische verbindingen zijn echter niet of niet gemakkelijk meetbaar.

Het controleren of monitoren van een fysische omgevingsconditie zoals (barometrische) druk, temperatuur, lichtregime, geluid, straling, vochtgehalte en/of luchtvochtigheid, een chemische omgevingsconditie zoals de concentratie van een chemische bestanddeel of chemische stof en bijvoorbeeld zuurgraad, of een biologische omgevingsconditie zoals de aanwezigheid van ongewenste micro-organismen in het ons omringende milieu of in een bepaald product, is thans in vele industrieën zeer gewenst.

De aanwezigheid van een pathogeen micro-organisme in een omgeving kan bijvoorbeeld worden vastgesteld door middel van het detecteren van dat micro-organisme zelf, bijvoorbeeld door middel van detectie van specifieke nucleïnezuursequenties, of door detectie van uitscheidingsproducten van dat organisme, bijvoorbeeld door middel van detectie van mycotoxines of "fungal volatiles".

Een probleem bij het bepalen van veranderingen in bovengenoemde omgevingscondities is dat zij in veel gevallen zeer kleine veranderingen betreffen die een proces reeds in grote mate kunnen beïnvloeden. Echter, dergelijke zeer kleine veranderingen in de omgeving zijn met huidige middelen en werkwijzen niet of nauwelijks meetbaar.

Voorts is een probleem bij het bepalen van veranderingen in bovengenoemde omgevingscondities dat niet altijd bekend is welke fysische, biologische of chemische parameters van de omgeving bij een bepaald proces een rol spelen of daarop invloed uitoefenen. De veranderingen in de omgevingsconditie zijn in dat geval niet of moeilijk te specificeren, hetgeen de controle en sturing van proces dat in die omgeving plaatsvindt bemoeilijkt.

Micro-organismen zijn zeer gevoelig voor de toestand van hun omgeving. In feite weerspiegelt de toestand van een micro-organisme de toestand van zijn omgeving. In situaties waarin één of slechts enkele

soorten (dominant) aanwezig zijn, is het mogelijk om reacties van die organismen op de omgeving te bepalen door het meten van (een deel van) de biochemische compositie van die micro-organismen. Als biochemische compositie kan in dit verband zeer geschikt (een deel van) de compositie van het transcriptoom, het proteoom of het metabooloom worden bepaald omdat  
 5 dit deel van de cellulaire of biochemische compositie van micro-organismen zeer sterk reageert op de omgeving.

In veel gevallen is echter sprake van een populatie van meerdere tot zeer vele soorten en/of stammen of zelfs phyla van micro-organismen die  
 10 in verschillende verhouding ten opzichte van elkaar voorkomen en die vaak allen op een verschillende wijze op de omgevingsconditie reageren. Dit bemoeilijkt het meten van de biochemische compositie van een micro-organisme. Aan welk micro-organisme dient te worden gemeten, en van welk micro-organismen zijn de verkregen meetgegevens afkomstig?

15 Verrassenderwijs is nu gevonden dat de samenstelling van een microbiële populatie informatie kan verschaffen over heersende omgevingscondities en over heersende procescondities en tevens over veranderingen daarin. Een microbiële populatie als geheel kan toegepast worden als meetinstrument voor het bepalen van een omgevingsconditie  
 20 en/of een verandering daarin omdat de samenstelling van genoemde populatie de heersende omgevingsconditie weerspiegelt.

De onderhavige uitvinding voorziet in een werkwijze voor het bepalen van een omgevingsconditie door het meten van een samenstelling van een microbiële populatie die is blootgesteld aan genoemde  
 25 omgevingsconditie.

De onderhavige uitvinding voorziet tevens in een werkwijze voor het bepalen van veranderingen in een omgevingsconditie door het meten van veranderingen in een samenstelling van een microbiële populatie die is blootgesteld aan genoemde veranderingen in een omgevingsconditie.

Verder voorziet de onderhavige uitvinding in een werkwijze voor het bepalen van een omgevingsconditie omvattende het meten van een samenstelling van een microbiële populatie die is blootgesteld aan genoemde omgevingsconditie, het correleren van genoemde samenstelling met een  
 5 tevoren opgebouwd gegevensbestand van een meervoudigheid van samenstellingen verkregen middels blootstelling van genoemde microbiële populatie aan een meervoudigheid van omgevingscondities en het bepalen van genoemde omgevingsconditie aan de hand van de uitkomst van genoemde correlatie.

10 Met de verbeterde werkwijze kunnen processen worden gecontroleerd en beheerst op basis van de veranderingen in een samenstelling van een microbiële populatie die al dan niet reeds aanwezig is in een proces of in een (proces)omgeving, of daarin wordt geïntroduceerd met het doel om een omgevingsconditie te bepalen middels een werkwijze  
 15 volgens de onderhavige uitvinding.

De verbeterde werkwijze heeft het voordeel dat zeer kleine veranderingen in de omgeving, of zeer lage concentraties van te detecteren stoffen of biologische cellen, welke voorheen niet of moeilijk meetbaar waren, nu ook gemeten kunnen worden.

20 Het is een voordeel van de onderhavige uitvinding dat snelheid van de meting, althans in potentie, hoog is. Voorts is een voordeel van onderhavige uitvinding dat analyseresultaten kunnen worden opgeslagen in een database of gegevensbestand waardoor een nieuwe meting vergeleken kan worden met reeds eerder gevonden resultaten waardoor de werkwijze  
 25 op den duur een voorspellende waarde krijgt. De verbeterde werkwijze wordt daarmee zelflerend.

Een ander voordeel van de onderhavige uitvinding is dat met de verbeterde werkwijze afwijkingen en veranderingen in een omgevings- of procesconditie reeds kunnen worden gedetecteerd voordat andere, meer  
 30 cruciale kenmerken van die omgevings- of procesconditie aantoonbaar

veranderen. De verbeterde werkwijze kan daarmee als  
waarschuwingssysteem fungeren.

Nog een ander voordeel van een werkwijze volgens de onderhavige  
uitvinding is dat een lage, en mogelijk op zichzelf niet meetbare,  
5 omgevingsconditie of prikkel versterkt kan worden weergegeven in een  
sterke verandering van de populatiesamenstelling

De onderhavige uitvinding maakt gebruik van het principe dat een  
micro-organisme in sterke mate op invloeden van buitenaf reageert. De  
intrinsieke veranderingen in het micro-organisme na het toedienen van een  
10 uitwendige prikkel (een omgevingsconditie) bestaan uit veranderingen in  
hoeveelheden en aard van biomoleculen als RNA, eiwit en metabolieten. Het  
totaal van dergelijke veranderingen is karakteristiek voor de aard van de  
prikkel die het micro-organisme van buitenaf ontvangt.

Onder invloed van een specifieke prikkel of omgevingsconditie  
15 veranderen echter niet alleen de concentraties van bovengenoemde  
biomoleculen in de micro-organismen. Als gevolg van het verschuiven van  
optimale omgevingscondities en de daarop volgende intrinsieke  
veranderingen in het micro-organisme veranderen tevens groei- en  
competitievermogen van de individuele micro-organismen in een populatie.  
20 Hierdoor verandert de samenstelling van de populatie. Een organisme dat  
eerst dominant aanwezig was kan op die manier geheel worden verdrongen  
door een organisme dat onder de gegeven omgevingscondities beter gedijt.

Op deze wijze kan een samenstelling van een microbiële populatie  
worden toegepast als een specifieke sensor om omgevingscondities te  
25 bepalen, om de mate van verandering in deze omgevingsconditie te bepalen,  
om de aard en hoogte van de prikkel vast te stellen en om de effecten van  
uiteenlopende prikkels op diverse processen te kunnen meten en daarmee  
deze processen te beheersen.

Met een samenstelling van een microbiële populatie wordt in de  
30 onderhavige uitvinding een groepsopbouw van een gemeenschap van micro-

organismen bedoeld waarbij sprake is van een gemeenschap van ten minste twee verschillende groepen micro-organismen en welke groepsopbouw zich in een in hoofdzaak stabiele toestand in een in hoofdzaak stabiele omgevingsconditie bevindt.

- 5 Met een groep van micro-organismen wordt hierin een groep micro-organismen bedoeld die onderscheiden kan worden ten opzichte van een andere groep op basis van één of meer specifieke genotypische of fenotypische kenmerken. Een dergelijke groep kan een taxonomische groep zoals een fylum, een familie, een soort of een stam omvatten, maar tevens  
10 een groep die methodologisch geclassificeerd wordt zoals een fylogenetisch cluster, een ribotype, een isolaat, een serotype, of een morfotype.

- Bij de bepaling van een samenstelling van een microbiële populatie kan de verhouding waarin de verschillende groepen ten opzichte van elkaar in de populatie voorkomen bepaald worden maar ook het aandeel van een  
15 groep in de populatie. Een verhouding of aandeel kan bijvoorbeeld worden uitgedrukt in een celtaal, maar ook in een gewicht van een cel of een celcomponent, zoals een gewicht van een nucleïnezuur, of een fluorescentie-intensiteit. De vakman zal begrijpen dat de wijze waarop een samenstelling van een microbiële populatie wordt uitgedrukt afhankelijk is van de  
20 methode waarmee deze samenstelling wordt bepaald.

Met een verandering in een samenstelling van een microbiële populatie wordt in de onderhavige uitvinding een absolute of relatieve toename of afname van het aandeel van een groep in de populatie bedoeld.

- Microbiële populaties die in een werkwijze volgens de onderhavige  
25 uitvinding toegepast kunnen worden kunnen micro-organismen als bacteriën, archaea, schimmels, gisten, protozoën en algen omvatten. Bij voorkeur worden microbiële populaties van bacteriën, gisten en/of schimmels toegepast in een werkwijze volgens de uitvinding, bij grote voorkeur bacteriën.



Microbiële populaties die van nature of procesmatig voorkomen in een specifiek proces kunnen in een werkwijze volgens de uitvinding worden toegepast voor het bepalen van een omgevingsconditie van datzelfde proces of in een geheel ander proces, bij voorkeur echter wordt de intrinsiek  
 5 aanwezige microbiële populatie toegepast. Dus, bij het controleren van processen waarbij specifieke populaties van micro-organismen een rol spelen zullen bij voorkeur de specifieke populaties van micro-organismen uit die processen worden toegepast.

Indien een proces plaatsvindt in de afwezigheid van een populatie  
 10 van micro-organismen, kan een populatie van micro-organismen kortere of langere tijd aan de procescondities worden blootgesteld, bijvoorbeeld door deze bij voorkeur vanaf het begin van het proces in de procesruimte te brengen, of door (een gedeelte van) de procesmaterie buiten de procesruimte in contact te brengen met een populatie van micro-organismen.

15 Zonodig kunnen de micro-organismen vooraf worden opgekweekt, zoals bijvoorbeeld geschiedt in een proces waarbij een gemengde starterculture als ent wordt toegepast. Het is in bepaalde uitvoeringsvormen mogelijk om de populatie van micro-organismen in een vooraf geüniformeerde of gestandaardiseerde of gedefinieerde samenstelling  
 20 toe te passen. Dit kan bijvoorbeeld het geval zijn indien de populatie van micro-organismen buiten de procesruimte wordt blootgesteld aan de procescondities zoals hierboven beschreven, bijvoorbeeld door deze bloot te stellen aan (een gedeelte van) de procesmaterie zoals een monster van water, lucht, bodem, voedsel, of wanneer de micro-organismen kortere of  
 25 langere tijd aan bepaalde procescondities worden blootgesteld met het doel de procescondities te bepalen.

Met een microbiële populatie van geüniformeerde of gestandaardiseerde of gedefinieerde samenstelling wordt in dit verband een populatie van micro-organismen bedoeld waarvan de samenstelling onder  
 30 gegeven omgevings- of procescondities bekend is. Indien een dergelijke

samenstelling van de populatie bij herhaling verkregen kan worden, bijvoorbeeld door het mengen van verschillende micro-organismen in een bekende verhouding, kan deze eveneens als standaard worden beschouwd.

Het is echter niet noodzakelijk dat de microbiële populatie in een  
 5 geüniformeerde of gestandaardiseerde of gedefinieerde samenstelling wordt toegepast. In feite is het meten van de populatiesamenstelling van micro-organismen die wordt toegepast in een werkwijze volgens de onderhavige uitvinding, of een verandering in die samenstelling, voldoende om de condities van de omgeving, of veranderingen daarin, te bepalen, zolang de  
 10 (verandering in) de populatiesamenstelling van micro-organismen gerelateerd kan worden aan een specifieke omgevings- of procesconditie.

Een microbiële populatiesamenstelling kan in de onderhavige uitvinding een populatie van micro-organismen omvatten waarvan de taxonomische positie van de individuele leden bekend is. Maar ook de  
 15 toepassing van microbiële populaties waarvan de taxonomische positie van de individuele organismen onbekend is, is mogelijk.

Zoals hierboven uiteengezet kan een samenstelling van een microbiële populatie in het onderhavige uitvinding worden bepaald door het uitvoeren van metingen aan biomoleculen van micro-organismen waarmee  
 20 het voorkomen van verschillende groepen, bijvoorbeeld soorten, micro-organismen in de populatie kan worden bepaald.

Geschikte biomoleculen die kunnen worden gemeten voor het bepalen van het voorkomen van verschillende groepen micro-organismen omvatten onder andere biologische macromoleculen als polysacchariden,  
 25 lipiden, polypeptiden en polynucleotiden.

Zo kunnen metingen worden toegepast waarmee de verschillende taxonomische groepen kunnen worden geïdentificeerd en eventueel gekwantificeerd, maar noodzakelijk is dit niet.

In bepaalde uitvoeringsvormen is het daarom mogelijk om de  
 30 samenstelling van een microbiële populatie te bepalen zonder de

taxonomische positie van de individuele groepen in een populatie te bepalen of de afzonderlijke micro-organismen te identificeren.

In het geval dat een dergelijke identificatie of bepaling van de taxonomische positie niet plaatsvindt is het mogelijk om de afzonderlijke micro-organismen in een samenstelling van een microbiële populatie toch onderscheidenlijk te duiden op basis van een "community fingerprint" of biomolecuair populatiepatroon. Hiertoe kan een scheiding van biologische macromoleculen die in bulk in de microbiële populatie voorkomen worden toegepast. Met dergelijke analyses van bulk macromoleculen kunnen in eerste instantie de individuele taxonomische niveaus in een populatie niet worden bepaald en kunnen de individuele leden van de populatie niet worden geïdentificeerd. Wel kan daarmee echter een "community fingerprint" van de populatiesamenstelling wordt verkregen. Door vergelijking van twee van dergelijke "community fingerprints", opgenomen op verschillende tijdstippen, kan een verandering in de populatiesamenstelling worden bepaald.

Dergelijke analyses van bulk macromoleculen van micro-organismen omvatten bijvoorbeeld één- of tweedimensionale electrophorese (SDS-PAGE) van eiwitten uit de gehele cel (Vauterin, L., Swings, J., and K. Kersters. 1994. Handbook of a New Bacterial Systematics. Goodfellow and O'Donnell, eds. San Diego, CA, Academic Press). Voorts kunnen voor het verkrijgen van een "community fingerprint" nucleïnezuren uit de gehele cellen van de populatie worden geanalyseerd middels werkwijzen als "genome profiling" (Nishigaki et al. 1991. Chem. Lett. 1097-1100), "bacterial restriction enzyme nucleic acid digest analysis" (BREND; Robinson et al. 1982. J. Med. Microbiol. 15:331-8), "pulsed-field gel electrophoresis" (PFGE; Swain et al. 1996. Appl. Environ. Microbiol. 62:994-7) in combinatie met restrictie endonuclease digestie van chromosomaal DNA, "(terminal) restriction fragment length polymorphism" ((T)RFLP; Dunbar et al. 2000. Appl. Environ. Microbiol. 66:2943-50; Park et al. 2002. Water Sci. Technol.

46:273-80) inclusief Ribotyping en AFLP™ (Vos et al. 1995. *Nucleic Acids Res.* 23:4407-14), "amplified ribosomal DNA restriction analysis" (ARDRA; Vaneechoutte et al. 1992. *FEMS Microbiol. Lett.* 72:227-33), "random amplified polymorphic DNA" (RAPD; Okamura et al. 1993. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 253:147-54), "denaturing gradient gel-electrophoresis" (DGGE; Muyzer et al. 1993. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:695-700), "temperature gradient gel electrophoresis" (TGGE; Felske et al. 1997. *Microbiology* 143:2983-9), "single strand conformational polymorphism" (SSCP; Widjoatmodjo et al. 1995. *J. Clin. Microbiol.* 33: 2601-2606.), "plasmid profiling" (Tannock et al. 1990. *J. Clin. Microbiol.* 28:1225-8), "plasmid fingerprinting" (Tenover. 1985. *Clin. Lab. Med.* 5:413-36) en/of "shot-gun cloning and sequencing" van geamplificeerde nucleïnezuur fragmenten (e.g. Giovannoni et al. 1990. *Nature* 345:60-3) worden toegepast. Voor een overzicht van mogelijke werkwijzen die zijn toe te passen in een meting voor bepaling van een samenstelling van een microbiële populatie wordt hierin verwezen naar *Molecular Microbial Ecology Manual*. 1998. Akkermans, van Elsas and de Bruijn, eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands, ISBN 0-7923-5343-9, en periodieke bijwerkingen daarvan.

20 Bij voorkeur worden voor het bepalen van een samenstelling van een microbiële populatie metingen toegepast waarbij tevens taxonomische identificatie plaatsvindt. Zo kunnen lagere taxonomische niveaus als stammen, variëteiten, ondersoorten en soorten, maar ook hogere taxonomische niveaus als geslachten, families, ordes, klassen en dergelijke worden bepaald. Tevens is het mogelijk om combinaties van verschillende taxonomische niveaus van micro-organismen te bepalen in een werkwijze volgens de uitvinding waarmee een populatiesamenstelling wordt gemeten.

Hiertoe kunnen zeer geschikt merkmoleculen worden toegepast voor het identificeren van taxonomische groepen van micro-organismen.

30 Dergelijke merkmoleculen omvatten onder andere (delen van) biologische

macromoleculen als polysacchariden, lipiden, polypeptiden en polynucleotiden die in de micro-organismen aanwezig zijn en die specifiek zijn voor een taxonomische positie.

Werkwijzen voor het identificeren van polypeptiden of eiwitten die kunnen worden toegepast als taxon-specifieke merker voor taxonomische identificatie van micro-organismen, zijn bij de vakman bekend en omvatten onder andere een combinatie van 2D gelelectrophorese en massaspectrometrie (MS) en "peptide display library" technologie (Smith & Scott. 1993. *Meth. Enzymol.* 217:228-257.)

Werkwijzen voor het identificeren van polynucleotiden of nucleïnezuursequenties die aanwezig zijn of tot expressie gebracht kunnen worden in één celpopulatie, maar niet in een andere, en daarom kunnen worden toegepast als taxon-specifieke merker zijn eveneens bij de vakman bekend en omvatten onder andere "subtractive cloning" (Sagerstrom et al. 1997. *Annu. Rev. Biochem.* 66:751-83), RAPD (Hadrys et al. 1992. *Mol. Ecol.* 1:55-63) en/of "subtractive hybridization" (el-Adhami et al. 1997. *J. Med. Microbiol.* 46:987-97).

Tevens kunnen voor identificatie van taxon-specifieke merkers de bovenbeschreven werkwijzen voor het bepalen van een "community fingerprint" worden gecombineerd met sequentieanalyse van uit een dergelijk patroon geïsoleerde en geselecteerde nucleïnezuurfragmenten. Een dergelijke gecombineerde werkwijze voor het identificeren van taxon-specifieke merkers, door combinatie van bulk en taxon-specifieke werkwijzen, kan bijvoorbeeld amplificatie en shot-gun clonering van ribosomale RNA genen uit de totale populatie gevolgd door partiele sequentieanalyse van de gecloneerde genen omvatten (zie bijv. Wilson & Blitchington. 1996. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2273-8), maar bijvoorbeeld ook scheiding van bulk-geamplificeerde RNA genen middels TGGE en partiele sequentieanalyse van geselecteerde, gescheiden fragmenten (zie bijv. Muyzer. 1999. *Curr. Opin. Microbiol.* 2:317-22) of bijvoorbeeld 2D

gelelectroforetische scheiding van eiwitten en het vervaardigen van antilichamen tegen geïsoleerde gescheiden eiwitten.

Geschikte taxon-specifieke polynucleotide merkmoleculen kunnen bijvoorbeeld (fragmenten van) ribosomaal RNA (bijvoorbeeld 5S, 5,8S, 9S, 12S, 16S, 18S, 23S of 25S, of de spacer regio's daartussen), transfer RNA, genomisch DNA, plasmide-gebonden DNA of mitochondrieel DNA omvatten. Bij voorkeur worden genomisch DNA gerelateerde en/of rRNA gerelateerde merkers toegepast.

Geschikte taxon-specifieke polypeptide merkmoleculen kunnen bijvoorbeeld (fragmenten van) intracellulaire en/of membraan gebonden enzymen zoals cytochroom b, cytochroom c oxidase, NADH dehydrogenase, ATP synthase en/of esterase omvatten. Dergelijke polypeptiden zijn daarom zo geschikt omdat daarvan taxonomisch geannoteerde databases beschikbaar zijn. Tevens kunnen taxon-specifieke antigenen worden gemeten in een werkwijze volgens de uitvinding.

Een werkwijze volgens de onderhavige uitvinding omvat bij voorkeur de toepassing van taxon-specifieke polypeptide merkmoleculen zoals nucleïnezuurmerkers.

Voor het bepalen van een samenstelling van een microbiële populatie met behulp van taxon-specifieke merkers kan gebruik worden gemaakt van één of meer technieken zoals:

- *in situ* meettechnieken zoals nucleïnezuur probe technieken (zie o.a. Amann et al. 1990. J. Bacteriol. 172:762-70) en/of immunologische meettechnieken; hierbij kunnen verschillende cellulaire bestanddelen afzonderlijk worden gemeten, zonder dat feitelijke scheiding daarvan plaatsvindt, door gebruik te maken van specifieke of a-specifieke detectietechnieken, waarvan de geschiktheid afhankelijk is van het te detecteren bestanddeel;
  - elektroforetische en/of chromatografische meettechnieken;
- hierbij kunnen de cellulaire bestanddelen worden gescheiden op basis van

o.a. grootte, gewicht, lading, gevoeligheid voor denaturatie, waarna detectie plaatsvindt met behulp van specifieke of a-specifieke detectietechnieken, waarvan de toepassing afhankelijk is van het te detecteren bestanddeel (zie bijv. *Molecular Microbial Ecology Manual*. 1998. Akkermans, van Elsas and de Bruijn, eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands);

- 5       -     micro-array en/of biochip technieken; hierbij worden biochemische bestanddelen gescheiden op basis van affiniteit voor een op een drager geïmmobiliseerde bindingspartner en vindt detectie plaats vindt met behulp van specifieke of a-specifieke detectietechnieken waarvan de
- 10       geschiktheid afhankelijk is van het te detecteren bestanddeel.

Geschikte detectietechnieken die in verband met bovenstaande technieken kunnen worden toegepast zijn onder andere autoradiografische detectietechnieken, op fluorescentie, luminescentie of fosforescentie gebaseerde detectietechnieken en chromogene detectietechnieken. Deze

15       technieken zijn in het vakgebied van de detectie van biomoleculen bekend.

Bij voorkeur wordt in de onderhavige uitvinding een samenstelling van een microbiële populatie gemeten door gebruik te maken van technieken waarbij specifieke biomoleculen worden gebonden aan micro-arrays van specifieke bindingspartners. Zo kunnen micro-arrays van

20       nucleïnezuur probes of nucleïnezuur imiterende probes, zoals PNA, worden toegepast voor detectie van taxon-specifieke polynucleotide merkers, of kunnen micro-arrays van bindingspartners van peptiden ("protein chips") of van antilichamen worden toegepast voor detectie van taxon-specifieke polypeptide merkers.

25       Werkwijzen voor het ontwikkelen van nucleïnezuur probes en voor het werken met polynucleotiden die toepasbaar zijn in de onderhavige uitvinding zijn bij de vakman bekend (zie o.a. Stahl & Amann 1991. *In: Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, Stackebrandt and Goodfellow, eds. pp. 205-48 Wiley, Chichester) en zijn beschreven in een

30       groot aantal handboeken waaronder *Molecular Cloning: A Laboratory*

Manual, 2nd Ed., Vol. 1-3, eds. Sambrook et al. Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) en Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al., Greene Publishing and Wiley-Interscience: New York (1987) en periodieke bijwerkingen daarvan.

- 5               Werkwijzen voor het ontwikkelen van peptide probes en voor het werken met micro-arrays voor detectie van taxon-specifieke polypeptiden die toepasbaar zijn in de onderhavige uitvinding zijn bij de vakman bekend en zijn beschreven in een groot aantal handboeken waaronder Proteomics, Palzkill ed. Kluwer Academic Publishers, 2002 en Peptide Arrays on  
10 Membrane Supports: Synthesis and Applications, Mahler ed. Springer-Verlag New York, 2002.

In een werkwijze volgens de onderhavige uitvinding verdient toepassing van een DNA micro-array de voorkeur. Dergelijke arrays omvatten oligonucleotiden met sequenties die specifiek zijn voor taxon-  
15 specifieke nucleïnezuurmerkers en worden in de onderhavige uitvinding tevens aangeduid met oligonucleotide array, vaste drager nucleïnezuur micro-array, DNA array of DNA biochip.

De vervaardiging van een DNA micro-array volgens de uitvinding kan worden uitgevoerd met behulp van werkwijzen die bij de vakman bekend  
20 zijn. De vervaardiging en het gebruik van DNA micro-arrays voor de detectie van specifieke nucleïnezuursequenties is veelvuldig beschreven in publicaties (US 5,571,639; Sapolsky *et al.*, 1999, Genet. Anal.-Biomolecular Eng. 14, 187-192; Chee *et al.*, 1996, Science 274:610-614, Shena *et al.*, 1995, Science 270, 467-470; Sheldon *et al.*, 1993, Clinical Chem. 39, 718-719;  
25 Fodor *et al.*, 1991, Science 251, 767-773) en handboeken (DNA Microarrays: A Molecular Cloning Manual. Bowtell & Sambrook, eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press (2002) ISBN: 0-87969-625-7).

De vakman zal in staat zijn om arrays naar eigen ontwerp en daarbij behorende array uitleesapparatuur te verkrijgen bij daarin  
30 gespecialiseerde toeleveranciers (bijvoorbeeld Affymetrix Corp., Santa



Clara, CA, USA voor DNA arrays en CIPHERGEN Biosystems, Fremont, CA, USA voor ProteinChip Array).

Een werkwijze volgens de uitvinding omvat in een voorkeursuitvoeringsvorm een vergelijking tussen tenminste twee  
 5 omgevingscondities, te weten, een standaard conditie en een experimentele conditie als gevolg waarvan de eventueel waargenomen verandering in een samenstelling van een microbiële populatie aan de veranderde omgevingsconditie kan worden toegeschreven.

Bij voorkeur zijn bedoelde metingen aan een samenstelling van een  
 10 populatie kwantitatief, maar ook semi-kwantitatieve of kwalitatieve metingen kunnen worden toegepast.

Het bepalen van een omgevingsconditie door het meten van een samenstelling van een microbiële populatie blootgesteld aan genoemde omgevingsconditie kan als een enkelvoudige meting worden uitgevoerd. Ook  
 15 kan een samenstelling van een microbiële populatie worden gemeten bij blootstelling aan een meervoudigheid van omgevingscondities waarbij één bepaalde, gedefinieerde omgevingsparameter op verschillende waarden wordt ingesteld. Op deze wijze kunnen specifieke veranderingen in een samenstelling van een microbiële populatie als gevolg van deze  
 20 veranderende omgevingsparameter worden bepaald.

Bij meting van een samenstelling van een microbiële populatie blootgesteld aan een meervoudigheid van bekende omgevingscondities waarbij één bepaalde, gedefinieerde omgevingsparameter op verschillende waarden, zoals verschillende pH, wordt ingesteld is het mogelijk om  
 25 referentiemetingen te verkrijgen aan de hand waarvan een referentiegegevensbestand opgebouwd kan worden. Een dergelijk gegevensbestand omvat bijvoorbeeld een eerste variabele  $p$  van verschillende waarden waarop een omgevingsparameter is ingesteld, en een tweede variabele  $X$  van verschillende samenstellingen van een microbiële  
 30 populatie die aan die omgevingsparameter is blootgesteld.

Op metingen van een samenstelling van een microbiële populatie kunnen verschillende analysetechnieken worden betrokken, zoals een statistische analyse, bijvoorbeeld een multivariantie analyse, of andere analysetechnieken zoals die thans bestaan of zoals die ontwikkeld kunnen worden voor toepassing in een uitvoeringsvorm volgens de uitvinding. In een werkwijze volgens de onderhavige uitvinding verdient toepassing van analyse methoden als "self-organising maps", hierarchische clustering, "multidimensional scaling", principale component analyse, "supervised learning", "k-nearest neighbours", "support vector machines", discriminant analyse en "partial least square" methoden de voorkeur. De genoemde analyse op de verzameling van meetresultaten die gezamenlijk een verandering in een samenstelling van een microbiële populatie als gevolg van veranderende, gedefinieerde omgevingscondities beschrijven, levert een waarde op voor de omgevingsparameter en daarmee voor de omgevingsconditie.

Bij het bepalen van een onbekende omgevingsconditie middels een werkwijze volgens de uitvinding geniet het de voorkeur om bedoelde referentiemetingen in een stadium voorafgaand aan de bepaling van de onbekende omgevingsconditie uit te voeren. Een gemeten samenstelling van een microbiële populatie die is blootgesteld aan de onbekende omgevingsconditie levert vervolgens na correlatie van genoemde samenstelling van een microbiële populatie met genoemd gegevensbestand een waarde voor die omgevingsconditie.

Een referentiegegevensbestand zoals toegepast in uitvoeringsvormen van de onderhavige uitvinding kan bijvoorbeeld de vorm van een virtuele ijklijn zijn. In dat geval zal een samenstelling van een microbiële populatie bijvoorbeeld als een variabele met een reële getalswaarde in het gegevensbestand zijn ingevoerd en zal een parameter van een omgevingsconditie als een andere variabele met een reële getalswaarde in het gegevensbestand zijn ingevoerd.

Voorts kan de dynamiek van een veranderende samenstelling van een microbiële populatie als resultaat in een gegevensbestand worden opgeslagen, op die wijze kunnen veranderingen in een omgevingsconditie al in een zeer vroeg stadium waargenomen worden. Met dynamiek wordt

5 hierin bedoeld de transitiekarakteristiek van een samenstelling van een microbiële populatie die in het stadium van overgang verkeert van een eerste in hoofdzaak stabiele toestand naar een tweede in hoofdzaak stabiele toestand. Een dergelijke transitiekarakteristiek kan bijvoorbeeld een kortstondige of plotselinge vermeerdering van een marginaal aanwezig

10 organisme omvatten, of een verandering in het massa-aandeel van een bepaald organisme in de populatie als gevolg van verkleining van de celomvang.

De toepassing van een gegevensbestand van samenstellingen van een microbiële populatie uit een bepaald proces kan bijvoorbeeld het

15 vergelijken van de uitkomst van een meting met resultaten van voorgaande metingen omvatten en tevens het toevoegen van de nieuwe meting aan het gegevensbestand als een nieuwe referentiemeting. Het gegevensbestand zal daarmee in omvang en detail toenemen waardoor resultaten steeds beter onderbouwd worden op basis van steeds meer nieuwe resultaten.

20 Het vergelijken van de uitkomst van een meting aan een samenstelling van een microbiële populatie met resultaten van voorgaande metingen kan zeer geschikt worden uitgevoerd door statistische correlatie van resultaten. In een alternatieve uitvoeringsvorm omvat het bepalen van een omgevingsconditie daarom onder andere de stap van het correleren van

25 een samenstelling van een microbiële populatie met een tevoren opgebouwd gegevensbestand van een meervoudigheid van samenstellingen verkregen middels blootstelling van genoemde microbiële populatie aan een meervoudigheid van omgevingscondities.

Een werkwijze volgens de uitvinding kan onder andere zeer

30 geschikt worden toegepast voor:

- kwaliteitsbewaking van water (mineraalwater, proceswater of zuiveringswater) door het meten van verschuivingen in microbiële populaties;
- 5 - controle (en eventueel bijsturing) van voedselbereidingsprocessen door middel van het meten van startercultures (o.a. voor kaas-, zuivel- en vleesindustrie);
- 10 - controle van spijsverterings-, immuunmodulatie- en colonisatieresistentiefunctie (i.e. gezondheid) van de darm ten behoeve van de novel en functional food industrie (o.a. pre- en probiotica) en medicijnontwikkeling (indicatief en contra-indicatief) door analyse van darmflora;
- controle van gezondheid van mond en huid door analyse van mond- en huidflora.
- 15 - optimalisering van gewasteelt in land- en tuinbouw en horticulture door analyse van bodemflora;
- optimalisering van biodegradatie van bijvoorbeeld xenobiotica in de bodem door analyse van bodemflora; en
- 20 - detectie van de proliferatie van ongewenste micro-organismen zoals bederforganismen, pathogenen en kwaliteitsverminderende micro-organismen in een product door blootstelling van het product aan een populatie van micro-organismen.
- detectie van verontreiniging in de (water)bodem door analyse van (water)bodemflora
- 25 - monitoring van huisflora (de natuurlijke microbiële populatie) van biologisch geteelde producten ter bewaking van kwaliteit en authenticiteit

## CONCLUSIES

1.        Werkwijze voor het bepalen van een omgevingsconditie door het meten van een samenstelling van een microbiële populatie die is blootgesteld aan genoemde omgevingsconditie.
2.        Werkwijze voor het bepalen van veranderingen in een  
5        omgevingsconditie door het meten van veranderingen in een samenstelling van een microbiële populatie die is blootgesteld aan genoemde veranderingen in een omgevingsconditie.
3.        Werkwijze voor het bepalen van een omgevingsconditie omvattende het meten van een samenstelling van een microbiële populatie die is  
10        blootgesteld aan genoemde omgevingsconditie, het correleren van genoemde samenstelling met een tevoren opgebouwd referentiegegevensbestand van een meervoudigheid van samenstellingen verkregen middels blootstelling van genoemde microbiële populatie aan een meervoudigheid van  
omgevingscondities en het bepalen van genoemde omgevingsconditie aan de  
15        hand van de uitkomst van genoemde correlatie.
4.        Werkwijze volgens één van de conclusies 1-3, waarin genoemde microbiële populatie bacteriën, schimmels en/of gisten omvatten.
5.        Werkwijze volgens één van de voorgaande conclusies, waarin genoemde microbiële populatie darmflora of bodemflora is.
- 20        6.        Werkwijze volgens één van de voorgaande conclusies, waarin genoemde microbiële populatie een microbiële populatie is die van nature of procesmatig voorkomt in een specifiek proces.
7.        Werkwijze volgens één van de voorgaande conclusies, waarin genoemde meting de toepassing van taxon-specifieke merkers omvat.
- 25        8.        Werkwijze volgens conclusie 7, waarin genoemde taxon-specifieke merkers nucleïnezuurmerkers zijn.

9. Werkwijze volgens conclusie 7 of 8, waarin genoemde samenstelling van een microbiële populatie wordt bepaald met behulp van één of meer micro-arrays.
10. Werkwijze voor het controleren of monitoren van een  
5 omgevingsconditie, omvattende een werkwijze volgens één van de conclusies 1-9.
11. Werkwijze voor het controleren van een proces, omvattende een werkwijze volgens conclusie 10.
12. Gebruik van een werkwijze volgens één van de conclusies 1-11,  
10 voor kwaliteitsbewaking van water, voor controle van een voedselbereidingsproces, voor controle van de gezondheid van darm, mond of huid, ter optimalisering van gewasteelt, ter optimalisering van biodegradatie in de bodem, voor de detectie van bodemverontreiniging of voor de detectie van ongewenste micro-organismen.
- 15 13. Gebruik van een werkwijze volgens één van de conclusies 1-11, voor het bepalen van een chemische en/of biologische stof in de bodem, de lucht en/of in waterig milieu.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☒ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**